

BEST AVAILABLE COPY

PCT/JP03/13958

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

29.10.03

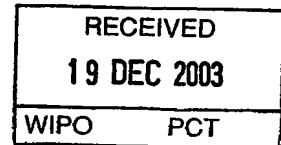
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年10月29日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-315091  
[ST. 10/C]: [JP2002-315091]

出 願 人  
Applicant(s): 科学技術振興事業団

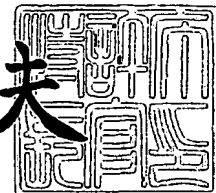


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年12月 4日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3100152

【書類名】 特許願  
【整理番号】 P029P03  
【提出日】 平成14年10月29日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A01K 67/027  
A61K 35/12  
C12N 15/37  
G01N 33/15  
G01N 33/50

## 【発明者】

【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区中山 4 - 1 8 - 1 - 5 0 6

【氏名】 高井 俊行

## 【発明者】

【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区南吉成 1 丁目 3 - 1 0

【氏名】 中村 晃

## 【発明者】

【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区花京院 2 - 2 - 1 6 - 2 0 1

【氏名】 菅原 章子

## 【発明者】

【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区米ヶ袋 1 - 3 - 3 7

【氏名】 矢島 佳央里

## 【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代表者】 沖村 憲樹

## 【代理人】

【識別番号】 100107984

【弁理士】

【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013099

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ギラン・バレー症候群及び／又はフィッシャー症候群発症モデル非ヒト動物

【特許請求の範囲】

【請求項1】  $Fc\gamma RII B$  遺伝子の機能が染色体上で欠損した非ヒト動物をガングリオシド GQ1b で免疫することにより得られ、ギラン・バレー症候群を呈することを特徴とするギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物。

【請求項2】 ギラン・バレー症候群がフィッシャー症候群であることを特徴とする請求項1記載のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物。

【請求項3】 尾及び後肢が麻痺する末梢神経傷害であることを特徴とする請求項1又は2記載のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物。

【請求項4】  $Fc\gamma RII B$  遺伝子欠損非ヒト動物が、げっ歯類動物であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物。

【請求項5】 げっ歯類動物が、マウスであることを特徴とする請求項5記載のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物。

【請求項6】 請求項1～5のいずれか記載のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物に、被検物質を投与し、該発症モデル非ヒト動物におけるギラン・バレー症候群の症状の程度を観察・評価することを特徴とするギラン・バレー症候群の治療薬のスクリーニング方法。

【請求項7】 請求項1～5のいずれか記載のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物に、被検物質を投与し、抗 GQ1b 抗体の出現の程度を測定・評価することを特徴とするギラン・バレー症候群及び／又はフィッシャー症候群治療薬のスクリーニング方法。

【請求項8】 請求項6又は7記載のギラン・バレー症候群治療薬のスクリーニング方法によって得られる治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ギラン・バレー症候群（フィッシャー症候群）を呈するモデル非ヒト動物に関する。特に、Fc $\gamma$ RIIB遺伝子の機能が染色体上で欠損した非ヒト動物（Fc $\gamma$ RIIB遺伝子欠損非ヒト動物）にガングリオシドGQ1bを免疫することにより得ることのできるギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物、及び、該モデル非ヒト動物を用いた、ギラン・バレー症候群治療薬のスクリーニング方法に関する。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

ギラン・バレー症候群（Guillain-Barre syndrome；GBS）は、感冒様症状を呈した後、1～2週間後に発症し、急速に進行する弛緩性の運動麻痺（四肢の筋力低下）、深部腱反射消失、嚥下障害、構音傷害、深部感覚障害、自律神経症状（不整脈、血圧の変動）を特徴とする、末梢神経における炎症性脱髄疾患である。ギラン・バレー症候群は年間人口10万人に対し2人の割合で発症し、日本全国で毎年約2000人～2500人が新たに罹患しているといわれている。しかし、これを完治し得る治療薬は未だ開発されていないばかりか、発症原因やメカニズムも明確には明らかにされておらず、いわゆる難病の類に分類され、特定疾患に指定されている。近年になって、本症候群に対する治療法として、血漿交換療法（プラズマフェレーシス）や抗ガンマグロブリン大量静注法が有効であることが報告され、また、本症候群の病因として、患者血清中に末梢神経に発現しているガングリオシドに対する自己抗体（抗糖鎖抗体）が検出され、病勢と関連することから、その発症機序にはガングリオシドと自己免疫反応が密接に関与していることが指摘されている。ガングリオシドはその分子構造からGM1、GM2、GD1a、GD1b、GT1a、GQ1b等に分けられ、該疾患において、患者血清中にはそれぞれに対する自己抗体が検出されている。特に、該ギラン・バレー症候群においては、血清中に抗ガングリオシド抗体として抗GM1抗体及び抗GD1a抗体が出現することが知られている。また、抗GQ1b抗体は、眼筋麻痺を伴うギラン・バレー症候群の急性期血清中や、フィッシャー症候群においてほぼ全例に特異的に上昇が認められている。

#### 【0003】

最近、ギラン・バレー症候群の原因として食中毒の原因菌の一つであるカンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) との関連が指摘されている。これは、カンピロバクターの糖鎖構造とガングリオシドとの間に分子相同性があり、これが自己反応性のT細胞やB細胞の出現につながると考えられている。しかし、現在まで自己抗体を含め、自己反応性T細胞やB細胞が実際の生体の病態につながるかどうかは証明されていない。動物実験レベルでは、ウサギにGD1bを免疫し、末梢神経障害を誘導した報告があるが、これまでマウスに各種ガングリオシドを免疫しても病態を発症することはなく、適切なギラン・バレー症候群の疾患モデルマウスは存在していなかった。また、上記のようにウサギに該疾患を誘導したものや、ラットに誘導したものは発症率が低く、また症状も軽いため、モデルとして不適切であった。更に、適切なモデル動物が存在しないため、治療薬や治療方法は開発されなかった。

#### 【0004】

同様に、ギラン・バレー症候群の亜型として、フィッシャー症候群 (Fisher's syndrome) が知られている。該フィッシャー症候群はギラン・バレー症候群の約5%が該当するといわれており、上気道感染などを先行感染として発症するもので、外眼筋麻痺、複視、運動失調、腱反射消失、顔面神経麻痺を生ずる。上記ギラン・バレー症候群と同様の症状を呈するが、ヒトにおいて四肢の麻痺は生じない。また、フィッシャー症候群については、ガングリオシドGQ1bに対する血中IgG抗体価の上昇が報告されているが、上記ギラン・バレー症候群と同様、その発症機序は解明されておらず、また、治療薬も開発されていない。

#### 【0005】

これらの病勢は罹病後1ヶ月位をピークに、数ヶ月から1年程で徐々に回復し、予後は比較的良好であるが、後遺症を残すことも少なくない。また、1年近くもの間、患者は精神的苦痛と入院・通院を余儀なくされるため、かかる疾患の治療薬、治療方法の開発は患者とその家族、医師達をはじめとする医療界から熱望されている。

#### 【0006】

他方、免疫系などの細胞の表面上には、IgのFc部分を認識して結合するレ

セプター（以下「FcR」という）が存在し、その中でも体液中のIgGの $\gamma$ 鎖に特異的に結合する受容体蛋白質であるFc $\gamma$ レセプター（以下「Fc $\gamma$ R」という）は遺伝子構造の類似性に基づいてタイプI（CD64抗原）、タイプII（CD32抗原）、タイプIII（CD16抗原）の3種に大きく分類されている。これらのうち、Fc $\gamma$ RIIは、他のFcRとは異なりモノマーのIgGに対して低親和性であり、免疫複合体となった多価IgGと結合し、単球、マクロファージ、多形核白血球（PMN）、マスト細胞、血小板、いくつかのT細胞リンパ球及びいくつかのB細胞リンパ球を含む造血幹細胞に広く発現する。また、Fc $\gamma$ RIIには遺伝子配列が異なるFc $\gamma$ RIIA、Fc $\gamma$ RIIB及びFc $\gamma$ RIICの3種類の受容体が存在しており、いずれの染色体も1q23に位置していることが知られている。

#### 【0007】

上記Fc $\gamma$ RIIBは、他のFcRとは異なり、 $\gamma$ 鎖と会合することなく、細胞内領域に抑制性シグナルを伝達するアミノ酸配列（Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif; ITIM）を有している（例えば、非特許文献1参照。）。このようなFc $\gamma$ RIIBの生理的機能を解明するために、本発明者らはFc $\gamma$ RIIB欠損マウスを既に作出し（例えば、非特許文献2参照。）、Fc $\gamma$ RIIB欠損マウスをタイプIIコラーゲンで免疫することによる関節炎モデルマウス（例えば、非特許文献3参照。）や、自己免疫疾患モデル動物を作製した（例えば、特許文献1参照。）。

#### 【0008】

##### 【特許文献1】

特開平08-289699号公報

##### 【非特許文献1】

Immunol. Rev. 125, 49-76, 1992、Science 256, 1808-1812, 1992

##### 【非特許文献2】

Nature 379, 346-349, 1996

##### 【非特許文献3】

J. Exp. Med. 189, 187-194, 1999

## 【0009】

## 【発明が解決しようとする課題】

これまで炎症性脱髄疾患であるギラン・バレー症候群の発症メカニズムを検討する際に適切なモデル動物がいなかった。本発明の課題は、ギラン・バレー症候群（フィッシャー症候群）を呈するモデル非ヒト動物を提供することにある。より詳しくは、Fc $\gamma$ RIIB遺伝子欠損非ヒト動物にガングリオシドGQ1bを免疫することにより得ることのできるギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物や、該モデル非ヒト動物を用いたギラン・バレー症候群治療薬のスクリーニング方法を提供することにある。

## 【0010】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究の結果、Fc $\gamma$ RIIB遺伝子欠損マウスを用い、ガングリオシドGM1、GM2、GD1a及びGQ1bを3週間毎に計4回フロイント・アジュバントとともに免疫し、ギラン・バレー症候群モデルマウスの作製を試みた。その結果、これらガングリオシド抗原を免疫したもののうち、GQ1bを免疫したFc $\gamma$ RIIB遺伝子欠損マウスにおいて尾及び後肢が麻痺する末梢神経障害を認めた。このマウスではGQ1bに対する抗体価が上昇することから、通常、ヒトで認められるGQ1bに対する自己抗体が認められるギラン・バレー症候群の亜型であるフィッシャー症候群（Fisher syndrome）に矛盾しない症状と考えられ、ギラン・バレー症候群（フィッシャー症候群）の新規疾患モデルマウスが得られることを見出し、本発明を完成するに至った。また、本発明に基づき、該症候群に対する有効な治療薬のスクリーニング方法を構築した。

## 【0011】

すなわち本発明は、Fc $\gamma$ RIIB遺伝子の機能が染色体上で欠損した非ヒト動物をガングリオシドGQ1bで免疫することにより得られ、ギラン・バレー症候群を呈することを特徴とするギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物（請求項1）や、ギラン・バレー症候群がフィッシャー症候群であることを特徴とする請求項1記載のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物（請求項2）や、尾



及び後肢が麻痺する末梢神経傷害であることを特徴とする請求項1又は2記載のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物（請求項3）や、Fc $\gamma$ RIIB遺伝子欠損非ヒト動物が、げっ歯類動物であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物（請求項4）や、げっ歯類動物が、マウスであることを特徴とする請求項5記載のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物（請求項5）に関する。

#### 【0012】

また本発明は、請求項1～5のいずれか記載のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物に、被検物質を投与し、該発症モデル非ヒト動物におけるギラン・バレー症候群の症状の程度を観察・評価することを特徴とするギラン・バレー症候群の治療薬のスクリーニング方法（請求項6）や、請求項1～5のいずれか記載のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物に、被検物質を投与し、抗GQ1b抗体の出現の程度を測定・評価することを特徴とするギラン・バレー症候群及び／又はフィッシャー症候群治療薬のスクリーニング方法（請求項7）や、請求項6又は7記載のギラン・バレー症候群治療薬のスクリーニング方法によって得られる治療薬（請求項8）に関する。

#### 【0013】

##### 【発明の実施の形態】

本発明のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物としては、Fc $\gamma$ RIIB遺伝子の機能が染色体上で欠損した非ヒト動物をガングリオシドGQ1bで免疫することにより得られ、ギラン・バレー症候群を呈する非ヒト動物であれば特に制限されるものではない。ここでギラン・バレー症候群とは、非遺伝性の疾患であって、感冒様症状を呈した後、1～2週間後に引き起こされ、急速に進行する弛緩性の運動麻痺（四肢の筋力低下）、深部腱反射消失、嚥下障害、構音傷害、深部感覚障害、自律神経症状（不整脈、血圧の変動）を特徴とする疾患やそれらに類似した疾患である。かかるギラン・バレー症候群を発症した場合、ガングリオシドGQ1bに対する血清中の抗体価が上昇し、より具体的には、外眼筋麻痺、複視、運動失調、腱反射消失、顔面神経麻痺、尾や後肢等の末梢神経障害等を生じる。また、上記ギラン・バレー症候群と同様の症状を呈するが、ヒトにおい

て四肢の麻痺を生じないフィッシャー症候群もギラン・バレー症候群の一つである。

#### 【0014】

本発明のFc $\gamma$ RIIB遺伝子欠損非ヒト動物としては、Fc $\gamma$ RIIB遺伝子機能が染色体上で欠損したモデル動物であればどのようなものでもよいが、マウスやラット等のげっ歯類、特に、該Fc $\gamma$ RIIB遺伝子の機能が染色体上で欠損したマウスを好適に挙げることができ、該Fc $\gamma$ RIIB遺伝子の機能が染色体上で欠損したマウスは、本発明者らの前掲の文献（非特許文献2）に記載する方法等によって作製することができる。具体的には、マウス遺伝子ライブラリーからPCR等の方法により得られた遺伝子断片を用い、Fc $\gamma$ RIIB遺伝子をスクリーニングし、スクリーニングされたFc $\gamma$ RIIB遺伝子を、ウイルスベクター等を用いてサブクローンし、DNAシーケンシングすることにより特定する。このクローンのS<sub>2</sub>エクソン及びEC<sub>1</sub>エクソンを含むフラグメントをpMC1ネオ遺伝子カセット等に置換することによって、ターゲットベクターを調製する。この線状化されたベクターをエレクトロポレーション（電気穿孔）法等によってES細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、G418等に抵抗性を示すES細胞を選択し、その細胞のクローンをマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型のマウスとインタークロスさせると、ヘテロ接合体マウスを得ることができ、また、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさせることによって、Fc $\gamma$ RIIBノックアウトマウスを得ることができる。

#### 【0015】

本発明におけるギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物の作製方法としては、ギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物を得ることのできる方法であればどのような方法でも良く、特に限定されるものではないが、前記のFc $\gamma$ RIIB遺伝子欠損非ヒト動物に、抗原としてガングリオシドGQ1bを免疫する方法を好適に例示することができる。また、免疫する方法としては、特に限定されるものではないが、初回免疫時にGQ1b抗原をコンプリート・フロイント・アジ

ユバントとともに免疫し、以後3週間毎にインコンプリート・フロイント・アジュバントとともに免疫する方法を好適に例示することができる。また、合計3～6回免疫するのが望ましいが、特に合計4回免疫するのが好ましい。

#### 【0016】

本発明において用いられるガングリオシドGQ1bは、ラクトシルセラミド(Cer)からb経路合成系で産生されるスフィンゴ糖脂質であって、シアル酸(Sia)を4つ有し、 $\text{Gal}\beta 1\rightarrow 3(3\leftarrow 2\alpha\text{Sia}3\leftarrow 2\alpha\text{Sia})\text{GalNAc}\beta 1\rightarrow 4\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4(3\leftarrow 2\alpha\text{Sia}3\leftarrow 2\alpha\text{Sia})\text{Glc}\beta 1\rightarrow 1'\text{Cer}$ の構造を有するスフィンゴ糖脂質をいう。これらのうち、該GQ1bの特性は、特有の糖鎖である $3\leftarrow 2\alpha\text{Sia}$ の結合形式によって特徴づけられている。また、各ガングリオシドには特異的な抗体が得られている。各ガングリオシドを認識する抗体は、上記の糖鎖 $3\leftarrow 2\alpha\text{Sia}$ の結合形式の相違を認識していることから、該抗GQ1b(モノクローナル)抗体も、4つの $3\leftarrow 2\alpha\text{Sia}$ の結合形式を特異的に認識していると考えられる。

#### 【0017】

本発明のギラン・バレー症候群治療薬のスクリーニング方法としては、本発明のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物を用い、該治療薬の薬理的効果を確認し、選別することのできるスクリーニング方法であれば特に限定されるものではないが、例えば、本発明のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物に被検物質を経口的又は非経口的に投与し、病状をスコア化して経時的に症状の程度(軽減の度合い)を観察・評価する方法や、本発明のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物に被検物質を投与し、該モデル非ヒト動物の血中に出現している抗GQ1b抗体の出現程度を測定・評価する方法を具体的に挙げることができる。上記血中に出現している抗GQ1b抗体の出現程度を測定する方法としては、2次抗体を用いたELISA分析を具体的に例示することができる。

#### 【0018】

本発明の上記スクリーニング方法により得られるギラン・バレー症候群治療薬は、ギラン・バレー症候群(フィッシャー症候群)を発症した患者の治療に用いることができる。本発明のギラン・バレー症候群治療薬は、経口的あるいは非経

口的に投与することができる。経口投与剤としては散剤、顆粒剤、カプセル剤、錠剤などの固形製剤あるいはシロップ剤、エリキシル剤などの液状製剤とすることができる。また、非経口投与剤として注射剤、経皮製剤あるいは座薬等とすることができる。これらの製剤は活性成分に薬理的、製剤学的に認容される助剤を加えることにより常法に従って製造することができる。また、投与量は、対象疾患の種類、患者の年齢、性別、体重、症状、投与形態に応じて適宜決定することができる。

#### 【0019】

##### 【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

参考例 (Fc $\gamma$ RIIB欠損マウスの作製)

129/Sv/J (H-2b) マウスのゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることによって、Fc $\gamma$ RIIB遺伝子のゲノムDNAのクローンを単離した。ターゲットベクターは、このクローンのS<sub>2</sub>及びEC<sub>1</sub>の2つの独立したエキソンを含む2.65KbのフラグメントをpMC1ネオ遺伝子カセット (東洋紡社製) に、置換することによって作製した。この線状化したベクターをエレクトロポレーションによってES細胞 (J1) に導入し、相同的組換えを行った。

#### 【0020】

上記の相同的組換えを起こしたES細胞からESクローンを単離し、G418及びGANC (ガンシクロピア) に対してネオマイシン耐性ESクローンをスクリーニングし、サザンブロット法によって相同的組換え体を同定した。その同定された相同的組換え体からゲノムDNAを単離して、HindIIIでダイジェストし、pMC1ネオ遺伝子カセットを含むターゲティングされた対立遺伝子を含んでいることを確認した。かかる確認されたESクローンを胚盤胞中にマイクロインジェクションし、キメラマウスを作製し、作製されたマウスを野生型のC57BL/6 (H-2b) マウスとインタークロスさせることによってヘテロ接合体マウスを得て、また、ホモ接合体マウスを得るために、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさせて、Fc $\gamma$ RIIB遺伝子の機能が染色体上で欠損したマ

ウス及びその野生型マウスを作製した。

#### 【0021】

実施例1 (Fc $\gamma$ RIIB遺伝子欠損マウスへの免疫)

ガングリオシドとして、GM1、GM2、GD1a、GD1b及びGQ1b (いずれもALEXIS社製)を用いた。各ガングリオシド1mg/mlを含むガングリオシド溶液1mlと、流動パラフィン、界面活性剤及び結核死菌からなる完全フロイントアジュバンド(CFA)3mg/mlとを連結シリンジ中で混合し、また各ガングリオシド1mg/mlを含むガングリオシド溶液1mlと、流動パラフィンと界面活性剤とからなる不完全フロイントアジュバンド(IFA)3mg/mlとを連結シリンジ中で混合して、2種類のエマルジョンを作製した。

#### 【0022】

上記参考例記載の方法により作製したFc $\gamma$ RIIB遺伝子欠損マウス(8週齢:雌雄差なし)(n=5)をエーテルで麻酔し尾背部を剃毛し、各ガングリオシドとCFAとをそれぞれ50 $\mu$ gと100 $\mu$ gとを含むエマルジョン150 $\mu$ lをマウスの皮内に注射して一次免疫を行い、その一次免疫後、3週間毎に3回、各ガングリオシドとIFAとをそれぞれ50 $\mu$ gと100 $\mu$ gとを含むエマルジョン150 $\mu$ lを皮内に注射し、ギラン・バレー症候群発症マウスの作製を試みた。また、対照としては野生型マウス(n=5)を用いた。その結果、GQ1bを免疫したFc $\gamma$ RIIB遺伝子欠損マウスにおいて、後肢と尾部に麻痺が生じる末梢神経障害を認めた。このマウスは後肢が開き、歩行することができず、また尾は垂れ下がっていた(図1;RIIB<sup>-/-</sup>)。一方、GM1、GM2、GD1a、GD1bを免疫したFc $\gamma$ RIIB遺伝子欠損マウスやコントロールである野生型マウス(図1;WT)においては、麻痺症状などが認められなかった。

#### 【0023】

実施例2 (麻痺症状スコア)

GQ1b免疫を行った野生型マウス及びFc $\gamma$ RIIB遺伝子欠損マウスについて、その症状によって点数化し、0点:無症状、1点:尾の麻痺、2点:尾及び両側後肢の麻痺、3点:尾及び四肢麻痺、4点:死亡の5段階に分けて評価した

。結果を図2に示す。なお、図2中、野生型マウスの点数は黒塗りの四角で表し、F c  $\gamma$  RIIB遺伝子欠損マウスの点数は白抜きの四角で表した。その結果、F c  $\gamma$  RIIB遺伝子欠損マウスにG Q 1 b免疫を行ったマウスは、ギラン・バレー症候群（フィッシャー症候群）の発症を認めた（図2）。

#### 【0024】

##### 実施例3（G Q 1 bに対する血清抗体価）

また、一次免疫後、3週、6週、9週及び12週後に採血を行い、G Q 1 b免疫を行った野生型マウス及びF c  $\gamma$  RIIB遺伝子欠損マウスの眼窩より採血を行ない、文献（Cell. Immunol. 145, 299-310, 1992）記載のE L I S A分析に改良を加えた次の方法により、G Q 1 bに対する抗体価を検査した。50 mM炭酸水素ナトリウム溶液（p H = 8. 5）1 m l に5  $\mu$  g のG Q 1 bを溶解させ、この溶解液を1 ウェル当たり50  $\mu$  l の割合で用い、正に帯電した96 ウェルマイクロプレート（N U N C社製）を4℃にて一晚コーティングした後、0. 05%のT w e e n 20と0. 1%のB S Aを含むP B Sで1回洗浄し、1 ウェル当たり250  $\mu$  l の0. 5%のB S Aを含むP B Sで4℃にて一晚ブロックした。次に上記血液から得られた血清を500に希釈し、その希釈した血清を1 ウェル当たり50  $\mu$  l の割合で上記96 ウェルマイクロプレートに加え、4℃にて一晚反応させた。反応後、96 ウェルマイクロプレートを0. 05%のT w e e n 20を含むP B Sで3回洗浄し、ペルオキシダーゼ（シグマ社製）が結合したヤギ抗マウスI g G 1、I g G 2 a又はI g G 2 bを500倍に希釈したものを50  $\mu$  l 加えて、4℃にて2時間インキュベートした。インキュベート後、再び0. 05%のT w e e n 20を含むP B Sで3回洗浄し、50  $\mu$  l のTureBlue Peroxidase Substrate（Kirkegaard & Perry Labs社製）と共に30分間室温で酵素反応を行った。その後、マイクロプレートリーダー（Biolumin 960; Molecular Dynamics社製）でO D 450を測定した。結果を図3に示す。なお、図3中、野生型マウスの吸光度は黒塗りの四角で表し、F c  $\gamma$  RIIB遺伝子欠損マウスの吸光度は白抜きの四角で表した。これらの結果から、F c  $\gamma$  RIIBノックアウトマウス（I I B - K O）は、野生型マウス（W i l d）に比べて、G Q 1 bに対する抗体価（I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b）の上昇が認められ、ギラン・バレー症候

群（フィッシャー症候群）の所見と矛盾していないことから、グッドパスチャー症候群発症モデルマウスが作製できたことがわかった。

#### 【0025】

##### 【発明の効果】

本発明のギラン・バレー症候群及び／又はフィッシャー症候群発症モデル非ヒト動物は、尾及び後肢に麻痺症状を呈し、ガングリオシドに対する抗体価が高いことから、ヒトにおけるギラン・バレー症候群及び該症候群の亜型であるフィッシャー症候群に合致する症状を発症しているとみなすことができ、これら症状の治療方法や治療薬の開発に用いることができる。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

本発明のギラン・バレー症候群及び／又はフィッシャー症候群発症モデル非ヒト動物の尾及び後肢が麻痺している様子（上図；RIIB<sup>-/-</sup>）及びコントロールとしての野生型マウス（下図；WT）を表す図である。

##### 【図2】

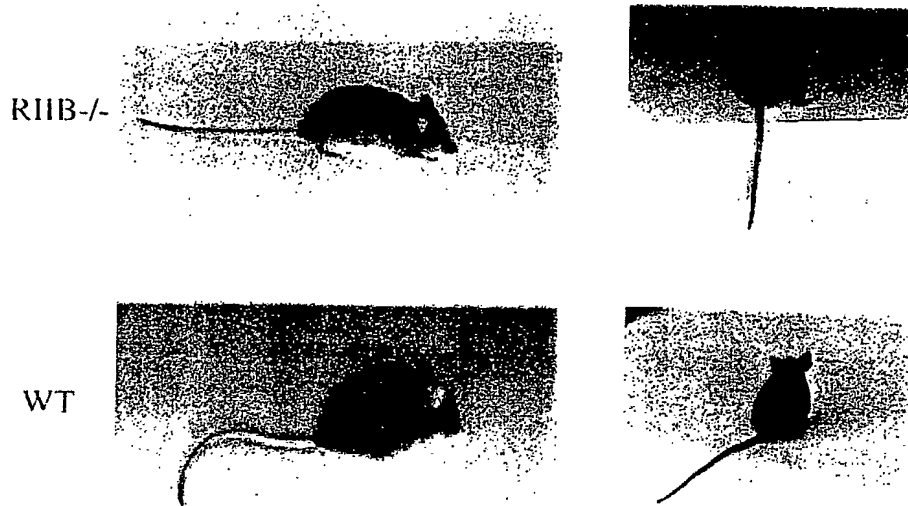
本発明のギラン・バレー症候群及び／又はフィッシャー症候群発症モデル非ヒト動物及びコントロールとしての野生型マウスの麻痺症状スコアを示す図である。

##### 【図3】

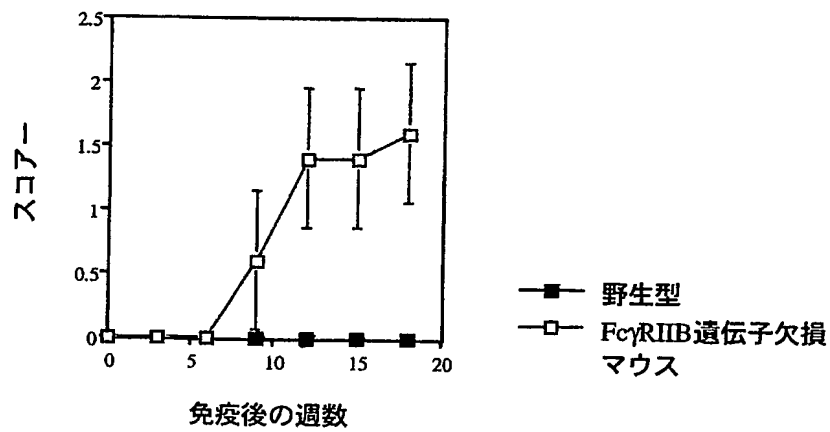
本発明のギラン・バレー症候群及び／又はフィッシャー症候群発症モデル非ヒト動物及びコントロールとしての野生型マウスの血清抗GQ1b抗体IgG1、IgG2a及びIgG2bの抗体価を示す図である。

【書類名】 図面

【図1】

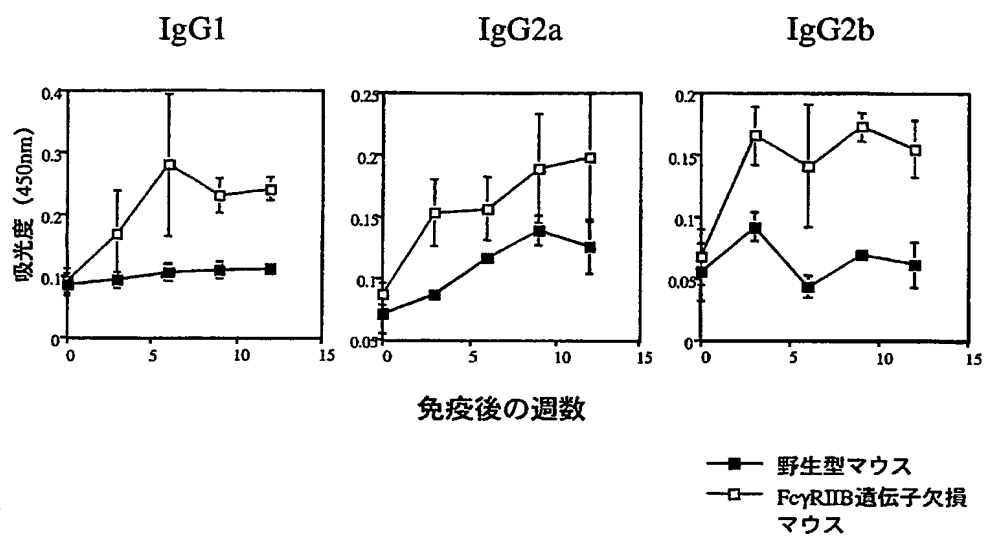


【図2】





【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 Fc $\gamma$ RIIB遺伝子欠損非ヒト動物にガングリオシドGQ1bを免疫することにより得ることのできるギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物や、該モデル非ヒト動物を用いたギラン・バレー症候群治療薬のスクリーニング方法を提供すること。

【解決手段】 Fc $\gamma$ RIIB遺伝子欠損マウスを用い、ガングリオシドGM1、GM2、GD1a及びGQ1bを3週間毎に計4回フロイント・アジュバントとともに免疫し、ギラン・バレー症候群発症モデルマウスを作製する。

特願2002-315091

出願人履歴情報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**